



**EFEK PEMBERIAN METFORMIN TERHADAP HIPERTROFI
JANTUNG DAN KESINTASAN PADA MENCIT PASCA-
INFARK MIOKARDIUM YANG DIINDUKSI
ISOPROTERENOL**

JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan guna mencapai
gelar sarjana strata 1 kedokteran umum**

**IHSAN FADILAH
22010110120066**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
2014**

LEMBAR PENGESAHAN JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA
EFEK PEMBERIAN METFORMIN TERHADAP HIPERTROFI
JANTUNG DAN KESINTASAN PADA MENCIT PASCA-
INFARK MIOKARDIUM YANG DIINDUKSI
ISOPROTERENOL

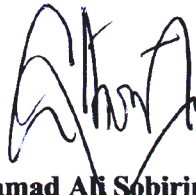
Disusun oleh

IHSAN FADILAH
22010110120066

Telah disetujui

Semarang, 22 Juli 2014

Pembimbing




dr. Mochamad Ali Sobirin, Ph.D.
19780613 200812 1 002

Ketua Penguji



dr. Amallia Nuggetsiana S., M.Si.Med.
19821201 200812 2 004

Penguji



dr. Budhi Surastri S., M.Si.Med.
19520102 198003 2 001

EFEK PEMBERIAN METFORMIN TERHADAP HIPERTROFI JANTUNG DAN KESINTASAN PADA MENCIT PASCA-INFARK MIOKARDIUM YANG DIINDUKSI ISOPROTERENOL

Ihsan Fadilah¹, Mochamad Ali Sobirin²

ABSTRAK

Latar belakang: *Cardiac remodeling* pasca-infark miokardium (IM) merupakan peristiwa penentu terjadinya gagal jantung. Salah satu bentuk *remodeling* ini yaitu hipertrofi jantung. Hipertrofi jantung merupakan faktor risiko yang independen terhadap kejadian gagal jantung. Metformin, obat golongan biguanida yang lazim digunakan dalam tatalaksana diabetes melitus tipe 2, dibuktikan memiliki efek kardioprotektif yang independen dari efek antidiabetesnya melalui mekanisme aktivasi AMPK. Meskipun demikian, penelitian yang dipublikasi mengenai pengaruh pemberian metformin terhadap hipertrofi jantung dan kesintasan pasca-IM masih sangat terbatas.

Tujuan: Diketuainya efek pemberian metformin terhadap luas penampang kardiomiosit (sebagai indikator hipertrofi jantung) dan kesintasan pada mencit pasca-IM yang diinduksi isoproterenol.

Metode: Empat puluh empat mencit Swiss betina dialokasikan secara acak menjadi empat kelompok (sebelas mencit pada tiap kelompok yaitu kontrol, metformin, isoproterenol, metformin+isoproterenol). Hipertrofi jantung pasca-IM diinduksi dengan injeksi subkutan isoproterenol 10 mg/kg/hari selama 2 hari. Metformin 300 mg/kg/hari selama 28 hari periode pasca-IM diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung untuk dilihat efeknya terhadap luas penampang kardiomiosit dan kesintasan.

Hasil: Pemberian metformin mampu menurunkan luas penampang kardiomiosit hingga 29,4% ($p = 0,001$) pada mencit dengan hipertrofi jantung pasca-IM. Meskipun demikian, model hipertrofi pasca-IM pada mencit ini belum adekuat untuk digunakan dalam penilaian *survival* karena tidak adanya perbedaan kesintasan antara kelompok hipertrofi dengan kelompok kontrol ($p = 0,098$).

Simpulan: Metformin mampu menurunkan luas penampang kardiomiosit pada mencit pasca-IM yang diinduksi isoproterenol. Namun, efek pemberian metformin terhadap kesintasan belum dapat diketahui.

Kata kunci: metformin, hipertrofi jantung, kesintasan, pasca-infark miokardium/pasca-IM, isoproterenol, luas penampang kardiomiosit.

¹Mahasiswa S-1 Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia. Korespondensi: ihsanfkundip@yahoo.com

²Staf Pengajar Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia.

THE EFFECT OF METFORMIN ADMINISTRATION ON CARDIAC HYPERTROPHY AND SURVIVAL IN POST-MYOCARDIAL INFARCTION MICE INDUCED BY ISOPROTERENOL

Ihsan Fadilah¹, Mochamad Ali Sobirin²

ABSTRACT

Background: Cardiac remodeling following myocardial infarction (MI) is a determinant of heart failure. One type of the remodeling is cardiac hypertrophy which is an independent risk factor for heart failure. Metformin, a biguanide drug commonly used for type 2 diabetes, is proven to have a cardioprotective effect unrelated from its antidiabetic properties via AMPK activation. However, there are a limited number of published observations concerning about the effect of metformin on cardiac hypertrophy and survival after MI.

Aims: To determine the effect of metformin on cross-sectional area of cardiomyocytes (as the indicator of cardiac hypertrophy) and survival in post-MI mice induced by isoproterenol.

Methods: Forty four female Swiss mice were randomly allocated into four groups (eleven mice each group viz. control, metformin, isoproterenol, metformin+isoproterenol). Post-MI cardiac hypertrophy was induced by subcutaneous injection of isoproterenol (10 mg/kg/day) in two consecutive days. Metformin (300 mg/kg/day) was given orally for 28 days after the induction and was seen for its effect on cardiomyocytes' cross-sectional area and survival.

Results: There was a 29,4% decrease in cross-sectional area of cardiomyocytes ($p = 0,001$) in the post-MI hypertrophic hearts. Yet, this cardiac hypertrophy model was not adequate to determine survival of the mice owing to there was no significant difference between the hypertrophic group and the control group in terms of survival ($p = 0,098$).

Conclusions: Metformin can decrease cross-sectional area of cardiomyocytes in post-MI mice. Nonetheless, its effect on survival is still unknown.

Keywords: metformin, cardiac hypertrophy, survival, post-myocardial infarction/post-MI, isoproterenol, cross-sectional area of cardiomyocyte.

¹Undergraduate Student of Medical Faculty, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia. Correspondence: ihsanfkundip@yahoo.com

²Lecturer of Pharmacology Department, Faculty of Medicine, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia.

PENDAHULUAN

Infark miokardium (IM) adalah suatu keadaan patologis pada otot jantung dimana terjadi nekrosis jaringan akibat iskemia yang signifikan dan berkepanjangan.^{1,2} Penyakit jantung iskemik ini merupakan penyebab utama kematian secara global.³ Kemajuan ilmu pengetahuan yang pesat dalam penatalaksanaan IM beberapa dekade terakhir memberikan dampak positif dengan turunnya angka mortalitas pada pasien-pasien IM.^{4,5} Gagal jantung adalah salah satu komplikasi pasca-IM yang lazim ditemui pada para *survivor* IM ini.⁴ Perkiraan insidensi gagal jantung pasca-IM mencapai 10-40% dengan angka median kesintasan hanya empat tahun sejak diagnosis ditegakkan dan angka harapan hidup setelah lima tahun sebesar 45%.⁵

Peristiwa penting yang bertanggung jawab sebagai penentu perjalanan klinis gagal jantung pasca-IM ialah *cardiac remodeling*.⁶ Salah satu proses yang berperan dalam *cardiac remodeling* ialah hipertrofi jantung.⁷ Hipertrofi jantung pasca-IM bahkan menjadi faktor risiko yang independen terhadap kejadian gagal jantung.⁸ Pentingnya peran hipertrofi jantung dalam patogenesis gagal jantung pasca-IM menjadikannya sebagai target terapeutik yang potensial untuk optimalisasi upaya pencegahan sekunder terjadinya gagal jantung pada para *survivor* IM. Namun, dengan segenap kemajuan medis terkini yang ada, insidensi gagal jantung pasca-IM masih tinggi.⁹ Selain itu, kesintasan para penderitanya pun sangat rendah sehingga kebutuhan akan terapi baru yang mampu menekan progresi gagal jantung menjadi krusial.⁹

Metformin dikenal sebagai obat lini pertama terpilih untuk diabetes melitus tipe 2.¹⁰ Dari studi-studi epidemiologis, ditengarai bahwa metformin memiliki pengaruh kardioprotektif yang independen dari efek antidiabetesnya.¹¹⁻¹³ Berbagai riset eksperimental laboratoris terdahulu mengindikasikan bahwa obat ini dapat berperan sebagai agen hipertrofi jantung yang potensial¹⁴⁻¹⁶ melalui mekanisme utamanya dalam mengaktivasi *AMP-activated protein kinase* (AMPK).^{17,18}

Meskipun demikian, penelitian yang dipublikasi mengenai pengaruh pemberian metformin terhadap hipertrofi jantung dan kesintasan pasca-IM masih sangat

terbatas. Oleh sebab itu, melalui penelitian ini, peneliti berhipotesis bahwa pemberian metformin mampu menurunkan luas penampang kardiomyosit (sebagai indikator hipertrofi jantung) dan meningkatkan kesintasan pada mencit pasca-IM yang diinduksi isoproterenol.

METODE

Empat puluh empat mencit Swiss (8 minggu, 25-30 gram) dialokasikan secara acak menggunakan tabel angka acak ke dalam empat kelompok (11 mencit/kelompok) yaitu: kontrol (K), isoproterenol (ISO), metformin (MET), dan metformin+isoproterenol (MET+ISO). Subjek diadaptasi selama tujuh hari sebelum penelitian dimulai.

Infark miokardium pada mencit kelompok ISO dan MET+ISO diinduksi dengan injeksi subkutan 10 mg/kg/hari^{19,20} isoproterenol hydrochloride (Sigma-Aldrich, Singapura) selama dua hari berturut-turut.²¹⁻²³ Mencit pada kelompok K dan MET diinjeksi aqua bidestilata steril secara subkutan dengan volume yang sepadan (0,1 ml). Dua puluh empat jam pasca-injeksi terakhir (periode pasca-IM), menggunakan sonde lambung, setiap subjek diberi metformin 300 mg/kg yang terlarut dalam aqua destilata (kelompok MET dan MET+ISO) atau aqua destilata (K dan ISO) setiap hari selama 28 hari dengan volume yang sama (0,1 ml).

Status hidup-mati mencit pada tiap kelompok selama periode pasca-IM diobservasi untuk analisis kesintasan. Hewan coba diberi pakan standar dan air minum harian *ad libitum* dengan siklus pencahayaan terang-gelap 12:12 jam. Dua puluh empat jam pascapenyondean terakhir, berat badan mencit diukur. Setelah itu, hewan coba diterminasi, diukur panjang tibianya, dan dilakukan pembedahan untuk evakuasi jantung. Setelah darah pada jantung dikeluarkan, berat jantung diukur. Kemudian, jantung dimasukkan dalam larutan *buffered neutral formalin* 10% untuk pembuatan preparat histopatologi. Cara perawatan, intervensi, dan terminasi hewan coba berpedoman pada *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.²⁴ Seluruh protokol dalam penelitian ini ditelaah dan disetujui

oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi, Semarang.

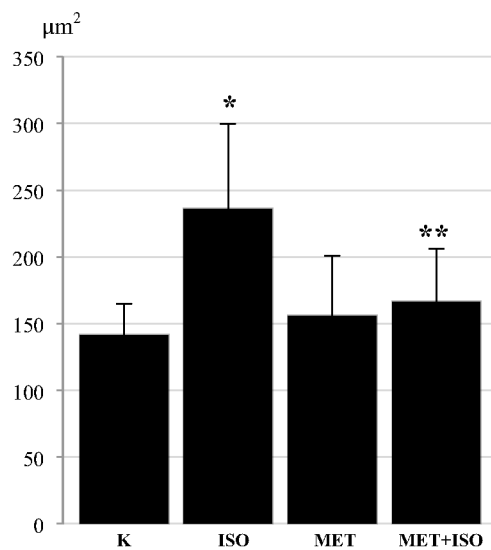
Pengukuran luas penampang kardiomiosit dilakukan pada foto preparat histopatologi jantung yang telah dicat dengan *Masson's trichrome*. Foto didapat menggunakan mikroskop binokuler (pembesaran objektif 40×) yang dilengkapi dengan kamera digital dan *image processor*. Pada tiga sampai lima lapangan pandang tiap sampel preparat, dipilih secara manual 15 kardiomiosit yang terpotong melintang dengan baik (rasio antara diameter terpanjang dan terpendek dari sel <1,2).²⁵ Rerata luas penampang kardiomiosit pada tiap kelompok diukur menggunakan *software* ImageJ.^{25,26}

Data dengan distribusi normal disajikan dalam rerata \pm standar deviasi (SD) sedangkan data dengan distribusi tidak normal disajikan dalam median (minimum-maksimum).^{27,28} Distribusi data dinilai secara analitik dengan uji Saphiro-Wilk. Varians data diuji dengan uji Levene. Uji *one way* Anova digunakan untuk membandingkan tiap set variabel data. Pada luaran *one way* Anova dengan nilai $p < 0,05$; analisis dilanjutkan dengan uji *post-hoc least significant difference* (LSD).²⁹ Analisis kesintasan dilakukan dengan metode Kaplan-Meier. Perbedaan kesintasan antar kelompok dianalisis menggunakan *log-rank (Mantel-Cox) test*.³⁰ Batas derajat kemaknaan ditetapkan $p < 0,05$. Penyajian dan analisis data diolah menggunakan program komputer.

HASIL

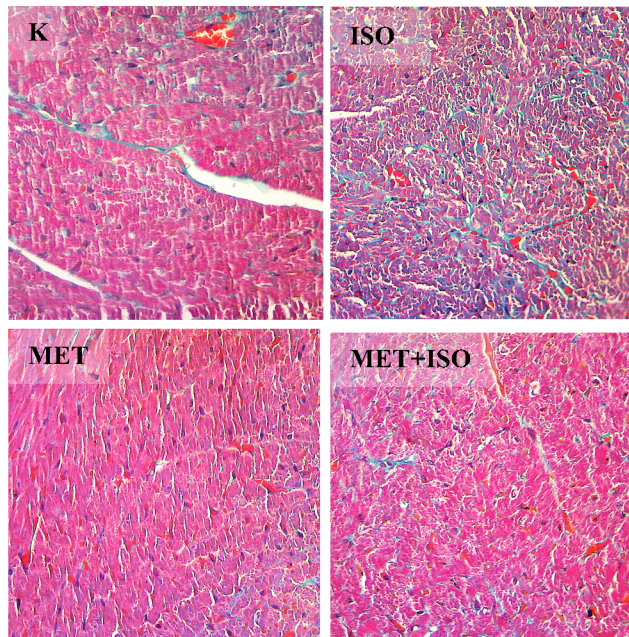
Dua puluh delapan hari pasca-IM, luas penampang kardiomiosit meningkat hingga 39,9% dari nilai *baseline* [$236,2 \pm 63,5$ (SD) μm^2 pada 9 mencit kelompok ISO vs. $141,9 \pm 23,1$ μm^2 pada 11 mencit kelompok kontrol, $p < 0,0001$]. Hal ini mengindikasikan terjadinya hipertrofi jantung pasca-IM. Tidak ada perbedaan antara rerata luas penampang kardiomiosit pada mencit yang diberi metformin saja tanpa induksi hipertrofi dengan subjek kontrol [$156,3 \pm 44,7$ μm^2 pada 11 mencit kelompok MET vs. $141,9 \pm 23,1$ μm^2 pada kelompok kontrol, $p = 0,446$] (Gambar 1 dan 2).

Pemberian metformin pada mencit dengan hipertrofi jantung pasca-IM mampu menurunkan luas penampang kardiomyosit sebesar 29,4% [$166,7 \pm 39,3 \mu\text{m}^2$ pada 11 mencit kelompok MET+ISO vs. $236,2 \pm 63,5 \mu\text{m}^2$ pada kelompok ISO, $p = 0,001$]. Nilai tersebut turun hingga sepadan dengan kelompok kontrol [$166,7 \pm 39,3 \mu\text{m}^2$ pada kelompok MET+ISO vs. $141,9 \pm 23,1 \mu\text{m}^2$ pada kelompok kontrol, $p = 0,193$] (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Luas penampang kardiomyosit

Data disajikan dalam rerata \pm SD. * $p < 0,0001$ vs. kontrol, ** $p = 0,001$ vs. isoproterenol, one way Anova dengan *post-hoc* LSD. Jumlah subjek per kelompok = 9–11. K = kontrol, MET = metformin, ISO = isoproterenol, MET+ISO = metformin + isoproterenol.



Gambar 2. Histopatologi jantung mencit (pembesaran objektif 40×)

Keterangan singkatan seperti gambar sebelumnya.

Sampai dengan hari ke-28 periode pasca-IM, tidak didapatkan adanya perbedaan pada karakteristik morfometrik antar kelompok yang meliputi berat badan, berat jantung, rasio antara berat jantung dan berat badan, maupun rasio antara berat jantung dan panjang tibia (Tabel 1).

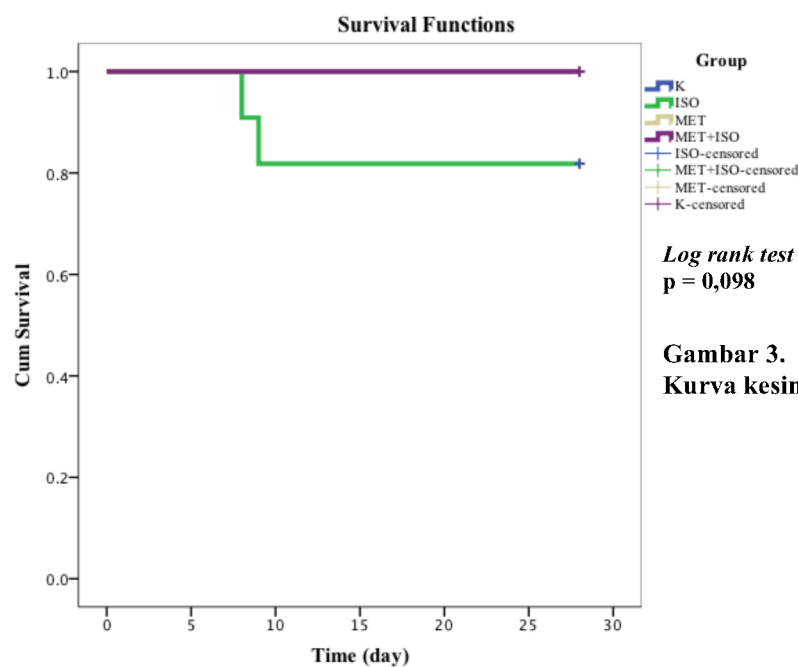
Tabel 1. Karakteristik morfometrik

Kelompok	Karakteristik Morfometrik			
	BB (g)	BJ (mg)	BJ/BB (mg/g)	BJ/PT (mg/mm)
K	26 (22–30)	130,0 ± 24,5	5,0 ± 0,9	6,0 ± 1,1
ISO	27 (23–31)	136,7 ± 20,6	5,2 ± 1,0	6,4 ± 1,0
MET	26 (22–31)	118,2 ± 18,9	4,6 ± 0,8	5,3 ± 0,7
MET+ISO	27 (25–36)	129,1 ± 23,9	4,6 ± 0,7	5,8 ± 1,1

Data disajikan dalam median (minimum-maksimum) atau rerata ± SD. * $p < 0,05$, one way Anova.

BB = berat badan, BJ = berat jantung, BJ/BB = rasio antara berat jantung dan berat badan, BJ/PT = rasio antara berat jantung dan panjang tibia.

Model hipertrofi jantung pasca-IM pada penelitian ini belum cukup adekuat digunakan untuk menilai kesintasan karena *survival* pada kelompok hipertrofi jantung pasca-IM yang diinduksi isoproterenol (dengan risiko) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol (tanpa risiko) (Gambar 3).



Gambar 3.
Kurva kesintasan Kaplan-Meier

PEMBAHASAN

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian metformin mampu menurunkan luas penampang kardiomyosit pada mencit pasca-IM yang diinduksi isoproterenol. Pemberian metformin (300 mg/kg/hari selama 28 hari) pada mencit pasca-IM dapat mereduksi cakupan hipertrofi jantung hingga 29,4% (Gambar 1). Hasil dari penelitian ini, yang juga mengonfirmasi efikasi metformin sebagai agen antihipertrofi jantung pada riset-riset sebelumnya,^{14-16,31} menyajikan temuan baru yang potensial untuk diaplikasikan secara lebih relevan dan aplikatif dalam praktik klinis terkait *timing* penggunaan metformin pada pasien-pasien pasca-IM. Penurunan luas penampang kardiomyosit oleh metformin yang diberikan *setelah* mencit mengalami IM mengindikasikan bahwa pemberian obat ini pascaserangan IM dapat mencegah terjadinya gagal jantung dengan cara menekan laju progresi hipertrofi jantung.

Efek antihipertrofi metformin pada penelitian ini yang ditunjukkan dengan adanya penurunan rerata luas penampang kardiomyosit, oleh pelbagai riset terdahulu, diketahui bahwa mekanisme dominan yang mendasarinya berkaitan dengan metformin sebagai AMPK *activator*.^{17,18} AMPK yang teraktivasi oleh metformin berfungsi untuk merestorasi energi selular dengan cara menghentikan jalur-jalur anabolik selular yang menyita ATP melalui fosforilasi enzim-enzim metabolik dan pelbagai faktor transkripsi yang krusial^{32,33} sehingga keseimbangan energi pulih kembali. AMPK juga diketahui mampu menghambat jalur *mammalian target of rapamycin* (mTOR) yang berperan dalam kontrol sintesis protein dan pertumbuhan sel^{33,34} pada hipertrofi jantung. *Downstream* dari mTOR yaitu *p70 ribosomal S6 protein kinase* (p70S6K) dan *4E-binding protein-1* (4EBP1) juga terlibat peran serupa.^{35,36} Selain itu, AMPK secara langsung memfosforilasi *eukaryotic elongation factor 2 kinase* (eEF2K) sehingga terjadi inhibisi elongasi protein hipertrofik yang dimediasi oleh fosforilasi eEF2.³⁷ Di samping mekanisme tersebut, bukti-bukti mengenai keterkaitan antara farmakodinamika metformin dan hipertrofi jantung secara utuh memang belum sepenuhnya dipahami dan

masih terus diteliti, seperti beberapa mekanisme lain yang ternyata bersifat independen dari AMPK.³⁸

Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian metformin dosis 300 mg/kg/hari secara per oral pada mencit dengan hipertrofi pasca-IM mampu menurunkan rerata luas penampang kardiomyosit. Peneliti meyakini bahwa temuan ini sah karena administrasi metformin secara per oral dilakukan menggunakan sonde lambung (*oral gavage*) sehingga tidak ada dosis residu harian yang tidak diterima oleh setiap subjek.³⁹ Meskipun begitu, Yin *et al.* melaporkan bahwa pemberian metformin dengan dosis 250 mg/kg/hari pada tikus dengan hipertrofi pasca-IM tidak berefek pada luas penampang kardiomyosit.⁴⁰ Temuan tersebut dimungkinkan terjadi karena peneliti memberikan metformin hanya secara *ad libitum* dengan melarutkannya dalam air minum hewan coba sehingga dosis efektif metformin sebagai agen antihipertrofi tidak tercapai. Selain itu, dosis yang diberikan pada tikus pasca-IM dalam riset tersebut lebih rendah dibandingkan dengan dosis metformin pada penelitian ini.

Penelitian ini belum berhasil menilai efek pemberian metformin terhadap kesintasan pada mencit pasca-IM sehingga kebenaran hipotesis mengenai ini masih inkonklusif. Salah satu alasan yang mungkin mendasari hal tersebut yaitu penggunaan mencit betina sebagai subjek penelitian. Pada awalnya, peneliti cenderung memilih mencit jantan sebagai subjek penelitian karena mencit jantan lebih rentan terhadap *outcome* IM dan *cardiac remodeling* sehingga akan lebih memudahkan pengamatan terkait sekuel-sekuel pasca-IM.⁴¹ Namun, menurut pengamatan peneliti lainnya⁴² serta pengalaman peneliti sendiri, mencit jantan cenderung sering berkelahi dengan sesamanya dalam satu kandang yang bahkan tidak jarang sampai menimbulkan luka dan perdarahan cukup serius. Perilaku ini tentu dapat menjadi faktor perancu dalam penelitian. Tindakan pemisahan kandang bagi mencit yang agresif tampaknya menjadi solusi yang baik. Sayangnya, tindakan ini juga dapat meningkatkan risiko stres isolatif pada mencit yang akhirnya juga dapat berdampak pada luaran penelitian.⁴³ Oleh sebab itu, dipilih mencit betina untuk menghindari lebih banyak faktor-faktor perancu

tersebut agar penarikan simpulan mengenai efek pemberian metformin terhadap luas penampang kardiomiosit yang menjadi fokus utama penelitian dapat lebih merepresentasikan keadaan yang sebenarnya. Seperti yang diduga, dimana tingkat ketahanan hidup mencit betina lebih baik daripada mencit jantan, hingga akhir pengamatan hanya dua mencit pada kelompok pasca-IM yang mengalami kematian. Selain itu, besar sampel dan waktu kesintasan mungkin merupakan suatu keterbatasan pada penelitian ini. Terlepas dari itu, pada penelitian ini, pemberian metformin pada mencit betina dengan hipertrofi jantung pasca-IM selama 28 hari meningkatkan kesintasan hingga 18,2% ($p = 0,098$, Gambar 3). Tren yang positif ini boleh jadi merupakan suatu indikasi adanya benefit terkait pemberian metformin terhadap kesintasan mencit dengan hipertrofi jantung pasca-IM.

Secara keseluruhan, temuan pada penelitian ini mengesankan bahwa terapi metformin pada *setting* klinis sebaiknya tidak hanya dimanfaatkan secara terbatas pada penatalaksanaan terkait hiperglikemia tetapi juga sebagai agen antihipertrofi jantung yang potensial bagi para *survivor* pasca-IM dengan lebih luas guna menekan angka mortalitas dan morbiditas pasien terkait gagal jantung.

SIMPULAN

Pemberian metformin mampu menurunkan luas penampang kardiomiosit pada mencit pasca-IM yang diinduksi isoproterenol. Meskipun demikian, efek pemberian metformin terhadap kesintasan pada mencit pasca-IM belum dapat diketahui.

SARAN

Diperlukan penelitian preklinis lanjutan mengenai mekanisme metformin dalam menekan progresi hipertrofi jantung dan metode penelitian yang optimal untuk menilai kesintasan pada mencit pasca-IM yang diinduksi isoproterenol.

DAFTAR PUSTAKA

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012; 126:2012-35.
2. Mendis S, Thygesen K, Kuulasmaa K, Giampaoli S, Mahonen M, Blackett KN, et al. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *International Journal of Epidemiology*. 2011; 40:139-46.
3. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2011.
4. Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, Cooper LS, Conwill DE, Clegg L, et al. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Engl J Med*. 1998; 339:861-7.
5. Fox CS, Evans JC, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Temporal trends in coronary heart disease mortality and sudden cardiac death from 1950 to 1999: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004; 110:522-7.
6. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—Concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35(3):569-82.
7. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000; 101:2981-8.
8. Rame JE, Dries DL. Heart failure and cardiac hypertrophy. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*. 2007; 9(4):289-301.
9. Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2008; 118(20):2057-62.
10. Cicero AFG, Tartagni E, Ertek S. Metformin and its clinical use: new insights for an old drug in clinical practice. *Arch Med Sci*. 2012; 8(5):907-17.
11. Abbasi F, Chu JW, McLaughlin T, Lamendola C, Leary ET, Reaven GM. Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2004; 53(2):159-64.
12. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 1998; 352(9139):1558.
13. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. Ten year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 359(15): 1577-89.
14. Chan AM, Soltys CM, Young ME, Proud CG, Dyck JR. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J Biol Chem*. 2004; 279(31):32771-9.
15. Fu YN, Xiao H, Ma XW, Jiang SY, Xu M, Zhang YY. Metformin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via AMPK activation. *Acta Pharmacol Sin*. 2011; 32(7):879-87.
16. Cha HN, Choi JH, Kim YW, Kim JY, Ahn MW, Park SY. Metformin inhibits isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2010; 14(6):377-84.
17. Wong AK, Howie J, Petrie JR, Lang CC. AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 116(8):607-20.
18. Beauloye C, Bertrand L, Horman S, Hue L. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovasc Res*. 2011; 90(2):224-33.
19. Engle SK, Jordan WH, Pritt ML, Chiang AY, Davis MA, Zimmermann JL, et al. Qualification of cardiac troponin I concentration in mouse serum using isoproterenol and implementation in pharmacology studies to accelerate drug development. *Toxicol Pathol*. 2009; 37:617-28.
20. De S, Adhikari S, Devasagayam TPA. Cardioprotective effects of an aminothiazole compound on isoproterenol-induced myocardial injury in mice. *Cell Biochem Biophys*. 2013; 67(2):287-95.
21. Khatua TN, Padiya R, Karnewar S, Kuncha M, Agawane SB, Kotamraju, et al. Garlic provides protection to mice heart against isoproterenol-induced oxidative damage: role of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 2012; 27(1):9-17.

22. Gupta P, Kanwal A, Putcha UK, Bulani Y, Sojitra B, Khatua TN, et al. Cardioprotective effect of ritonavir, an antiviral drug, in isoproterenol induced myocardial necrosis: a new therapeutic implication. *Jornal of Translational Medicine*. 2013; 11:80.
23. Murugesan M, Revathi R, Manju V. Cardioprotective effect of fenugreek on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Indian J Pharmacol*. 2011; 43:516-9.
24. National Research Council of the National Academies. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2011.
25. Helms SA, Azhar G, Zuo C, Theus SA, Bartke A, Wei JY. Smaller cardiac cell size and reduced extra-cellular collagen might be beneficial for hearts of Ames dwarf mice. *Int J Biol Sci*. 2010; 6(5):475-90.
26. Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med*. 2009; 59(4):339-43.
27. Teori sederhana prosedur pemilihan uji hipotesis. In: Dahlan MS. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. Jakarta (Indonesia): Salemba Medika; 2011. p. 1-29.
28. Statistik deskriptif. In: Dahlan MS. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. Jakarta (Indonesia): Salemba Medika; 2011. p. 31-60.
29. Uji hipotesis komparatif variabel numerik lebih dari dua kelompok. In: Dahlan MS. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. Jakarta (Indonesia): Salemba Medika; 2011. p. 87-128.
30. Analisis kesintasan (Survival analysis). In: Sastroasmoro S, Ismael S. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis*. Jakarta (Indonesia): Sagung Seto; 2011. p. 245-63.
31. Gundewar S, Calvert JW, Jha S, Toedt-Pingel I, Ji SY, Nunez D, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res*. 2009; 104(3):403-11.
32. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(10):774-85.
33. Hue L, Rider MH. The AMP-activated protein kinase: more than an energy sensor. *Essays Biochem*. 2007; 43:121-137.
34. Hardie DG. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007; 47:185-210.
35. Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanocershelde JL. Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2008; 79:238-48.
36. Proud CG. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J*. 2007; 403:217-34.
37. Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol*. 2002; 12:1419-23.
38. Labuzek K, Liber S, Gabryel B, Okopien B. Metformin has adenosine-monophosphate activated protein kinase (AMPK)-independent effects on LPS-stimulated rat primary microglial cultures. *Pharmacol Rep*. 2010; 62(5):827-48.
39. Hoggatt A, Hoggatt J, Honerlaw M, Pelus LM. A spoonful of sugar helps the medicine go down: a novel technique to improve oral gavage in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010; 49(3):329-34.
40. Yin M, van der Horst IC, van Melle JP, Qian C, van Gilst WH, Sillje HH, de Boer RA. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301(2):H459-68.
41. Wu JC, Nasser BA, Bloch KD, Picard MH, Scherrer-Crosbie M. Influence of sex on ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J Am Soc Echocardiogr*. 2003; 16(11):1158-62.
42. Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Baumans V. Male management: coping with aggression problems in male laboratory mice. *Lab Anim*. 2003; 37:300-13.
43. Kaliste-Korhonen E, Eskola S. Fighting in NIH/S male mice: consequence for behaviour in resident-intruder tests and physiological parameters. *Lab Anim*. 2000; 34:189-98.